

# VU Research Portal

## The role of biotransformation in the estrogenicity of xenobiotics

Reinen, J.

2010

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Reinen, J. (2010). *The role of biotransformation in the estrogenicity of xenobiotics*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Samenvatting

Mensen worden gedurende hun hele leven dagelijks blootgesteld aan een grote verscheidenheid lichaamsvreemde stoffen. Deze zogenaamde xenobiotica moeten, in de meeste gevallen, worden omgezet in meer wateroplosbare metabolieten om te kunnen worden uitgescheiden door het lichaam in de urine en/of de feces. Dit proces wordt biotransformatie genoemd en resulteert meestal in de ontgiftiging van de gemetaboliseerde stoffen. Echter, in sommige gevallen leidt biotransformatie tot de vorming van metabolieten met verhoogde therapeutische of toxische effecten. Dit proces wordt bioactivatie genoemd en kan in het geval van een verhoogde therapeutische werking verklaard worden door een verhoogde activiteit of affiniteit van de metaboliet vergeleken met de uitgangsstof ten opzichte van een enzym of receptor. Eventuele toxische effecten kunnen veroorzaakt worden door een toegenomen chemische reactiviteit wat kan leiden tot covalente binding aan DNA, eiwitadduct formatie of de vorming van zuurstofradicalen.

Het endocriene systeem is één van de belangrijkste communicatiesystemen van het menselijk lichaam en het is aangetoond dat dit systeem gevoelig is voor de toxische effecten van xenobiotica. Stoffen die in staat zijn om het endocriene systeem te ontregelen worden 'endocrine disrupting chemicals' (EDCs) genoemd. De effecten van een EDC worden veroorzaakt door ontregeling van de synthese, de secretie, het transport, de binding, de actie of de eliminatie van natuurlijke hormonen in het lichaam die verantwoordelijk zijn voor het regelen van de homeostase, de voortplanting, de ontwikkeling en het menselijk gedrag. Van veel milieurelevante xenobiotica, zoals weekmakers, vlamvertragers, pesticiden en andere persistent aanwezige organische verontreinigingen, is bekend dat het EDCs zijn. Daarnaast is ook voor stoffen, die van nature in de voeding aanwezig zijn, aangetoond dat ze hormonale effecten kunnen hebben.

Het hoofddoel van het onderzoek, wat beschreven is in dit proefschrift, was de ontwikkeling en validatie van methodes om de rol van biotransformatie in de estrogeniciteit van xenobiotica te onderzoeken. De eerste twee eiwitten waar het onderzoek op werd gefocust waren de humane estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) en het humane sulfotransferase 1E1 (SULT1E1) enzym aangezien beide eiwitten een rol spelen in de regulering van het endocriene systeem in het menselijk lichaam en gerelateerd zijn aan toxische effecten. Het derde eiwit dat onderzocht werd was het bacteriële cytochroom P450 BM3 (CYP102A) enzym afkomstig van *Bacillus megaterium*. P450 BM3 is één van de meest actieve P450s en is een oplosbaar en zeer stabiel enzym waarvoor aangetoond is dat de substraatselectiviteit en activiteit kunnen worden gemanipuleerd met behulp van diverse genetische modificatietechnieken. Hierdoor is dit enzym een uitgelezen kandidaat om gebruikt te worden voor biocatalytische applicaties om metabolieten te produceren van xenobiotica, welke mogelijkwijs endocriene effecten kunnen hebben.

In **Hoofdstuk 1** worden het endocriene systeem, ER $\alpha$  en SULT1E1 geïntroduceerd. Er wordt uitgelegd dat SULT1E1 een kritieke rol speelt in de biotransformatie van endogene estrogene steroïdes en dat remming van de SULT1E1 activiteit door EDCs kan leiden tot verschillende ongewenste verschijnselen. Er wordt verder uitgelegd dat ER $\alpha$  mede verantwoordelijk is voor de effecten van steroïdes op de groei, de ontwikkeling en het functioneren van een divers aantal weefsels en dat EDCs de werking van deze steroïdes kunnen nabootsen, verhogen of remmen wat kan leiden tot toxische effecten. Voorbeelden uit de literatuur zijn gebruikt om duidelijk te maken dat xenobiotica endocrien versturende effecten kunnen hebben en dat dit geleid heeft tot

negatieve gezondheidseffecten voor zowel mensen als dieren in het wild. De rol van cytochroom P450 monooxygenases (P450s) in de biotransformatie van xenobiotica is besproken en er is uitgelegd dat deze biotransformatie kan leiden tot bioactivatie van EDCs. Dit betekent dat P450s in principe ook gebruikt kunnen worden om grotere hoeveelheden metaboliet te produceren die vervolgens gebruikt kunnen worden voor structuuropheldering en farmacologische en toxicologische studies. Er wordt uitgelegd dat P450 BM3 een zeer geschikte kandidaat is voor dit soort doeleinden en beschikbare methodes om nieuwe P450 BM3 mutanten te creëren en identificeren worden kort besproken. Tevens wordt uitgelegd dat deze BM3 mutanten gebruikt kunnen worden om de rol van biotransformatie door P450s in de estrogeniciteit van xenobiotica te onderzoeken.

In **Hoofdstuk 2** is de ontwikkeling en validatie van een methode om remming van de SULT1E1 activiteit te meten beschreven. Voor deze op fluorescentie gebaseerde HPLC-methode is het aangetoond dat hij geschikt is voor het screenen van remmers en het meten van SULT1E1 activiteit en dat hij snel, gevoelig en makkelijk toe te passen is. De methode maakt gebruik van het fluorescente en selectieve SULT1E1 substraat 1-hydroxypyrene (OHP) en is een verbetering ten opzichte van andere methodes welke gebruik maken van radioactieve of carcinogene stoffen. Het doel van **Hoofdstuk 3** was om te onderzoeken of er verschillen bestaan in de remming van de SULT1E1 activiteit in muizen en mensen door EDCs. Voor in totaal 34 EDCs is de remming van de SULT1E1 activiteit voor de mens en de muis *in vitro* gemeten en computermodellen zijn gebruikt om de gevonden verschillen te rationaliseren. Hierbij kwamen verschillende zaken aan het licht die mogelijk een aantal bekende verschillen, waaronder het wel of niet optreden van substraat-inhibitie, tussen beide enzymen kunnen verklaren. **Hoofdstuk 4** beschrijft de ontwikkeling van een hoge resolutie screenings (HRS) meetmethode die (metaboliet)mengsels kan scheiden en tegelijkertijd de ER $\alpha$  affiniteiten van de gescheiden componenten van het mengsel kan meten met behulp van een detectiemethode, die gebaseerd is op fluorescentie polarisatie. Het voordeel van deze detectiemethode is dat de kans dat autofluorescentie optreedt veel kleiner is dan in de reeds bestaande methodes het geval is en er is aangetoond dat de methode succesvol is toegepast om de affiniteit van afzonderlijke producten in metabolietmengsels te meten. **Hoofdstuk 5** beschrijft de toepassing van de ontwikkelde SULT1E1 inhibitie assay en een HRS methode, welke gebruik maakt van het substraat coumestrol, om te onderzoeken of deze methodes gebruikt kunnen worden om verschillen aan te identificeren tussen gezonde brasems en brasems die symptomen van endocriene disruptie vertonen.

Het tweede gedeelte van het proefschrift is vooral gericht op het screenen en het gebruik van bacteriele P450 BM3 mutanten, die ontwikkeld zijn om biologisch actieve metabolieten van geneesmiddelen en andere xenobiotica te produceren. **Hoofdstuk 6** beschrijft de ontwikkeling en evaluatie van een methode om het potentieel van BM3 mutanten om geneesmiddelen te metaboliseren te onderzoeken die gebaseerd is op een LC-MS gebaseerde scheidingstechnologie. In plaats van het screenen van een groot aantal mutanten voor de activiteit richting slechts één of twee substraten hebben wij ervoor gekozen om een klein aantal mutanten te testen tegen een groot aantal geneesmiddelen. Op deze manier hebben wij een viertal diverse mutanten kunnen selecteren die niet alleen van toegevoegde waarde kunnen zijn voor de productie van belangrijke metabolieten voor toxicologische studies, maar ook gebruikt kunnen worden in de zoektocht naar nieuwe geneesmiddelen aangezien ze mogelijk moleculen kunnen bioactiveren op nieuwe posities. In **Hoofdstuk 7** is de ontwikkeling en applicatie van een alternatieve on-line

screeningsmethode om de activiteit en diversiteit van BM3 mutanten te onderzoeken beschreven en deze op fluorescentie gebaseerde methode is gebruikt om aan te tonen dat affiniteitsprofielen gebruikt kunnen worden om de diversiteit van BM3 mutanten te onderzoeken. In **Hoofdstuk 8** zijn BM3 mutanten gebruikt om grote hoeveelheden metabolieten te produceren van de stof zearalenone (ZEN). Vervolgens is aangetoond dat HRS gebruikt kan worden om de ER $\alpha$  affiniteit van de gevormde metabolieten te meten. Hiermee wordt duidelijk aangetoond dat de combinatie van deze beide methodes van grote toegevoegde waarde kan zijn om in de toekomst de mogelijke bioactivering van xenobiotica tot estrogeen actieve producten te onderzoeken.

Het voornaamste doel van het onderzoek, de ontwikkeling en validatie van methodes om de rol van biotransformatie in de estrogeniciteit van xenobiotica te onderzoeken, is grotendeels bereikt. Het uitvoeren van de experimenten welke beschreven zijn in dit proefschrift heeft geleid tot meer inzicht in de effecten welke EDCs kunnen hebben op de biotransformatie processen welke gereguleerd worden door SULT1E1. Tevens zijn er nieuwe methodes ontwikkeld om de rol van door P450s geregleerde biotransformaties van xenobiotica en de mogelijke ER $\alpha$  affiniteiten van de gevormde metabolieten te onderzoeken. Het grote potentieel van BM3 mutanten om geneesmiddelen te metaboliseren en toegepast te worden voor biocatalytische doeleinden om te helpen bij de risicoschatting van xenobiotica is ook aangetoond. De resultaten en experimenten welke beschreven zijn in dit proefschrift kunnen zodoende mogelijkwerwijs gebruikt worden voor het onderzoeken van milieurelevante vraagstukken en bieden diverse mogelijkheden tot vervolgonderzoek.